

Biophysikpraktikum

Versuch:

Kontrolle glykolytischer Oszillationen

I Ziel des Versuches

Es soll die nichtlineare Dynamik von komplexen Stoffwechselwegen anhand des glykolytischen Zuckerabbaus in einem Hefeextrakt vermittelt werden. Hierzu werden grundlegende Techniken zur Analyse und Auswertung nichtlinearer Stoffwechselforgänge vorgestellt. Die Bedeutung von autokatalytischen Reaktionen für die Regulation von Oszillationen wird durch externe Manipulation der Aktivator/Inhibitor Konzentrationen erarbeitet.

II Aufgabenstellung:

Durch Zugabe von Substraten (Zucker) sollen in einem Hefeextrakt glykolytische Oszillationen ausgelöst und deren Dynamik anhand von Periode und Amplitude charakterisiert werden. Zu unterschiedlichen Phasen der Oszillationen werden entweder Aktivator oder Inhibitor der Phosphofruktokinase zugegeben und aus der Reaktion darauf die Bedeutung von Adeninnukleotiden für die Kontrolle der oszillatorischen Glykolyse ermittelt.

III Literatur:

- 1 Molecular Biology of the Cell, Alberts, B. et al (Hrsg.) 1994 (3. Auflage), Garland Publishing Inc, New York.
- 2 Biochemical Oscillations and Cellular Rhythms, Goldbeter, A. (Hrsg.) 1996, Cambridge University Press.
- 3 Hess, B. und Boiteux, A.: Oscillatory Phenomena in Biochemistry. Annu. Rev. Biochem. (1971) **40**, 237-258.

IV Notwendige Vorkenntnisse:

Enzymkinetik, Absorptions- Fluoreszenzspektroskopie, Arbeiten in biochemischen/chemischen Laboren.

V Grundlagen zum Versuch:

A Allgemeines

Die Glykolyse (griechisch: Glyko= süß, Lysis=Auflösen) ist ein zentraler Stoffwechselweg in nahezu allen lebenden Organismen. Sie stellt die Verstoffwechslung von Zucker (z. B. Glukose, Fruktose) in Pyruvat dar (Abbildung 1). Dabei wird die in dem Zucker enthaltene Energie in Form biologisch verwertbarer Energie umgewandelt. Dies geschieht durch Phosphorylierung des energiearmen Adenosindiphosphat (ADP) zu dem energiereichen Adenosintriphosphat (ATP).

Die primäre Funktion der Glykolyse ist also die Gewinnung von Energie aus Zucker. Zusätzlich sind einige Zwischenprodukte der Glykolyse wichtige Vorstufen für die Synthese

zelleigener Bausteine, wie z. B. Aminosäuren oder Lipide. Daraus resultiert, daß die Glykolyse mit einer Vielzahl anderer Stoffwechselwege zu einem komplexen metabolischen Netzwerk verknüpft ist (Abbildung 2).

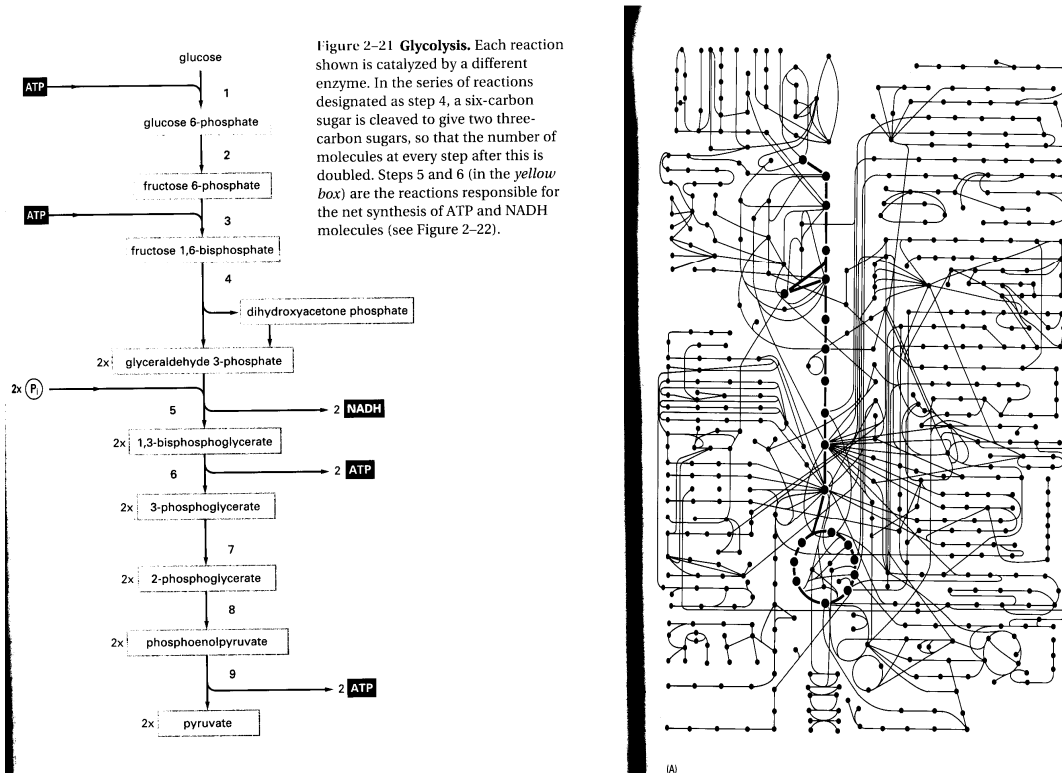


Abbildung 1: Schema der Glykolyse
Reaktion 3 wird durch die Phosphofruktokinase katalysiert, Reaktion 5 durch die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und Reaktion 8 durch die Pyruvatkinase. Entnommen aus: The Cell, Alberts, XY et al. (eds.), 1995,

Abbildung 2: Metabolisches Netzwerk
Die Punkte stellen Intermediate des Stoffwechsels einer Zelle dar, die Linien deren Verknüpfungen. Die Glykolyse und der Zitronensäurezyklus sind hervorgehoben.

B Glykolytische Oszillationen

Versuche mit lebenden Hefezellen und mit einem Extrakt aus Hefezellen haben gezeigt, daß die Glykolyse einen oszillatorischen Reaktionsverlauf haben kann. Wird Glukose zu Hefezellen oder Trehalose (ein Disaccharid, das aus 2 Glukoseeinheiten besteht, Zweifachzucker) zu einem Hefeextrakt gegeben, dann weisen sämtliche glykolytischen Intermediate rhythmische Konzentrationsänderungen auf.

C Allosterie der Phosphofruktokinase

Eine wichtige Funktion für die Erzeugung von Oszillationen übt das Enzym Phosphofruktokinase (PFK) aus (Abbildung 1 und 4). Dieses Enzym ist allosterisch reguliert. Es besteht aus mehreren Untereinheiten, die jede für sich Bindungsstellen für Substrate und Effektoren

besitzen. Die Untereinheiten können, in Abhängigkeit der besetzten Substratbindungsstellen, miteinander kooperieren. Als Ergebnis dieser Kooperation gehen die Untereinheiten von einer gering aktiven T-Form in eine hoch aktive R-Form über. Daraus resultiert ein sigmoider Verlauf für die Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Substratkonzentration (Abbildung 3). Zusätzlich besitzen die Untereinheiten noch Bindungsstellen für positive und negative Effektoren (hierauf begründet sich der Begriff Allosterie = an anderer Stelle), die das Gleichgewicht zwischen T- und R-Form verschieben. Solche Effektoren können die Halbsättigungskonstante (Michaelis-Konstante = K_M) und/oder die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) des Enzyms verändern. Positive Effektoren verringern K_M und/oder erhöhen V_{max} . Negative Effektoren erhöhen K_M und/oder verringern V_{max} . Basierend auf diesen Eigenschaften allosterischer Enzyme, wurde ein Modell erstellt, das den oszillatorischen Reaktionsverlauf der Glykolyse durch positiven und negativen Feedback der PFK-Aktivität beschreibt.

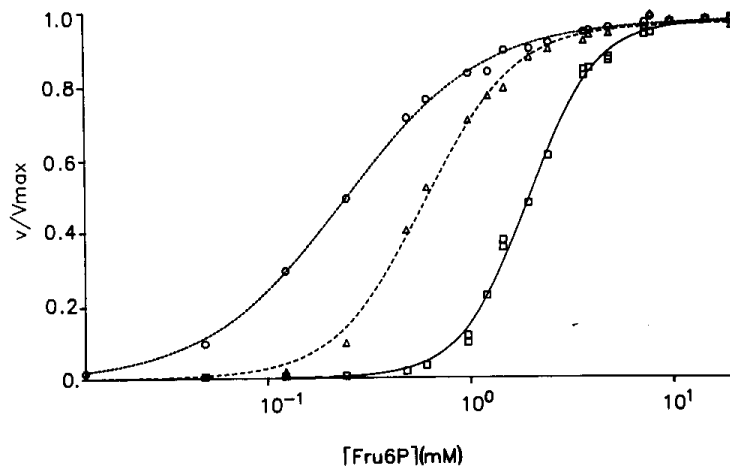


Fig. 7. Activity of PFK 1 as a function of [Fru6P] with no Fru(2,6)P₂ and AMP (□), 1 μM Fru(2,6)P₂ (Δ) and 1 mM AMP (○). [ATP] = 0.5 mM. $K_{0.5}$ and n_H (curves from right to left): 1.99 mM and 2.61; 0.62 mM and 1.98; 0.24 mM and 1.29

Abbildung 3: Allosterische Regulation der Phosphofruktokinase

Aufgetragen ist die Aktivität der PFK als Funktion der Substratkonzentration ohne und mit Aktivator (AMP, F-2,6-P₂).

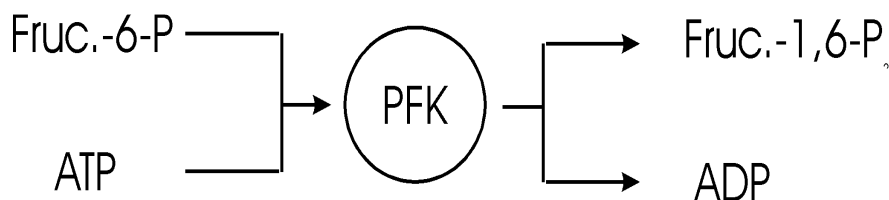


Abbildung 4: Reaktionsschema der Phosphofruktokinase

PFK = Phosphofruktokinase, Fruc.-6-P = Fruktose-6-Phosphat, Fruc.-1,6-P₂ = Fruktose-1,6-Diphosphat, ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat.

D Modell der Oszillationen

Die PFK katalysiert die Phosphorylierung von Fruktose-6-Phosphat zu Fruktose-1,6-diphosphat. Als Phosphatdonor fungiert ATP und es entsteht ADP (Abbildung 4). ATP wirkt als Substrat und negativer Effektor gleichzeitig (Substratinhibierung). Da die Bindungskonstante der Substratbindungsstelle für ATP deutlich geringer ist als die der negativen Effektorbindungsstelle, tritt bei niedrigen Konzentrationen von ATP erst eine Aktivierung des Enzyms auf. ADP ist Produkt und positiver Effektor des Enzyms (Produktaktivierung). Die Bindungskonstante der positiven Effektorbindungsstelle ist kleiner als die der negativen Effektorbindungsstelle, d. h. bei niedrigen Konzentrationen von positiven und negativen Effektoren wird hauptsächlich der positive Effektor wirksam.

Basierend auf diesen Eigenschaften der PFK, wurde von Goldbeter ein 2-Variablen Modell zur Modellierung glykolytischer Oszillationen aufgestellt, in dem nur die PFK und deren Produktaktivierung durch ADP berücksichtigt wird. Das Modell ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

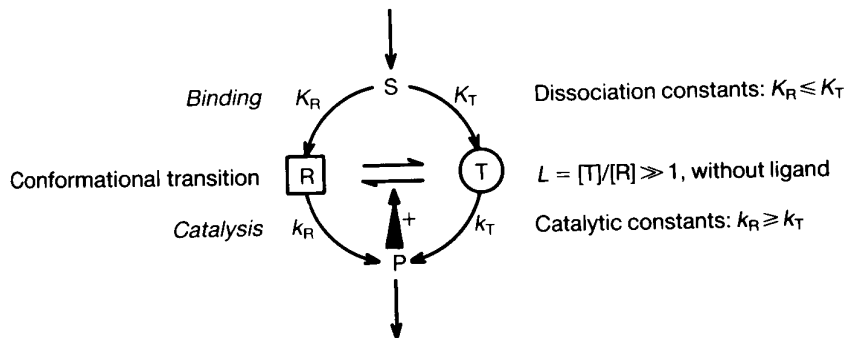


Abbildung 5: Modell für die autokatalytische Regulation der Phosphofruktokinase

Das Enzym besteht aus mehreren Untereinheiten, die entweder in der R- oder T-Konformation vorliegen. Diese beiden Konformationen unterscheiden sich in ihrer Affinität zum Substrat (K_R , K_T) und der katalytischen Aktivität (k_R , k_T). Die Umwandlung der beiden Formen ineinander geschieht konzertiert (Monod-Modell), d. h. durch Bindung des Substrates/Aktivators gehen alle Untereinheiten eines Enzymmoleküles gleichzeitig in die R-Form über.

In diesem Modell ist das Produkt (ADP) Aktivator. Das Substrat S wird mit konstanter Geschwindigkeit zugeführt. Das Produkt bindet nur an die R-Form. Der Abbau des Produktes verläuft mit einer Geschwindigkeit, die proportional seiner Konzentration ist (linearer Abbau). Das Verhältnis zwischen der T- und R-Form wird durch die allosterische konstante L angegeben.

Das 2-Variablen System wird durch folgende Gleichungen beschrieben:

$$\frac{d\alpha}{dt} = v - \sigma\phi = f(\alpha, \gamma) \quad (1)$$

$$\frac{d\gamma}{dt} = q\sigma\phi - k_s\gamma = g(\alpha, \gamma)$$

mit $\alpha = \text{Substrat } (S/K_R)$, $v = \text{Substratzufuhrtrate}/K_R$, $\sigma = \text{maximale Reaktionsrate der PFK}/K_R$, $\gamma = \text{Produkt } (P/K_P)$, $q = K_R/K_P$, $k_s = \text{Ratenkonstante für die Produktentfernung}$ und $\phi = \text{eine Ratenfunktion, welche die allosterische Regulation der PFK beschreibt (enthält die Parameter } \alpha \text{ und } \gamma)$. Für den vereinfachten Fall, daß die PFK nur aus 2 Untereinheiten besteht, hat diese Funktion folgende Form:

$$\phi = \frac{\alpha(1+\alpha)(1+\gamma)^2}{L + (1+\alpha)^2(1+\gamma)^2} \quad (2)$$

$$\text{mit } L = \frac{[T - \text{Form}]}{[R - \text{Form}]} = \frac{k_1}{k_2}.$$

In diesen Gleichungen sind sämtliche Parameter durch geeignete Quotientenbildung dimensionslos. Dies erleichtert die numerische Analyse des Gleichungssystems (1), da unterschiedliche Dimensions- und Konzentrationsangaben nicht mehr berücksichtigt werden müssen. Zur Charakterisierung des Gleichungssystems (1) werden die beiden Nullklinen im Phasenraum aufgetragen. Die Substrat-Nullkline nimmt die Form:

$$\frac{d\alpha}{dt} = 0 \Rightarrow v = \sigma\phi$$

und die Produkt-Nullkline die Form:

$$\frac{d\gamma}{dt} = 0 \Rightarrow \gamma = \frac{q\sigma}{k_s} \phi$$

an. Im Phasenraum-Diagramm (Abbildung 6) nehmen Substrat- und Produkt-Nullkline eine charakteristische Form für oszillatorische Systeme an. Die Produkt-Nullkline ist typischerweise N-förmig. Der Schnittpunkt der beiden Kurven gibt den Gleichgewichtszustand an. Während eines oszillatorischen Zyklus durchläuft das System einen sogenannten Limit-Zyklus im Phasenraum.

Allosteric model for glycolytic oscillations

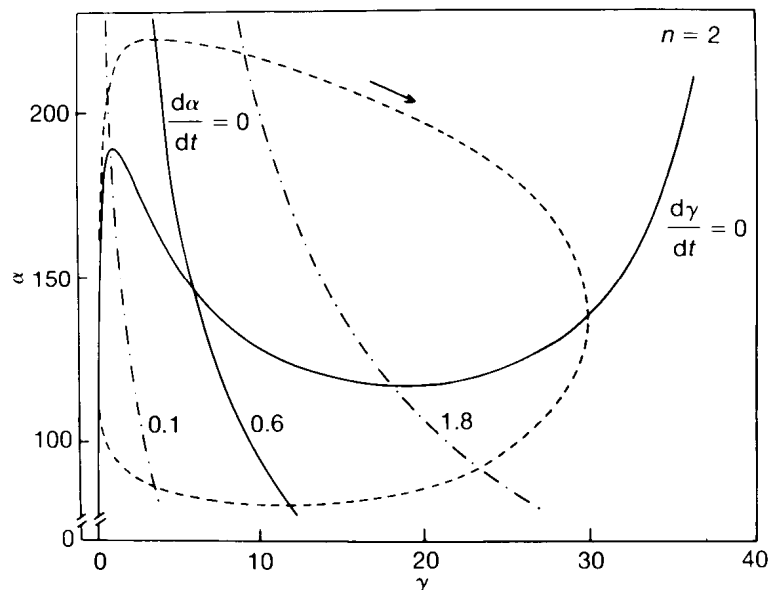


Abbildung 6: Phasenraum-Diagramm des Modelles aus Abb. 5

Die Substrat-Nullkline ($\frac{d\alpha}{dt} = 0$) ist für 3 verschiedene Substratzufuhrraten eingezeichnet (0,1, 0,6, 1,8). Der Pfeil zeigt die Richtung an, in die sich das System auf dem Limit-Zyklus bewegt. Weitere Erklärungen im Text.

Die Lage des Schnittpunktes der beiden Nullklinen bestimmt dabei, ob diese Limit-Zyklus Oszillationen spontan auftreten (instabiler Gleichgewichtszustand). Eine notwendige Voraussetzung für spontane Oszillationen ist, daß der Schnittpunkt auf einem Ast der Produkt-Nullkline mit negativer Steigung liegt ($\frac{d\alpha}{d\gamma} < 0$). Das Phasenraum-Diagramm in Abbildung 6 zeigt, wie der Gleichgewichtspunkt auf der Produkt-Nullkline als Funktion der Substratzufuhr rate v von einem instabilen in einen stabilen Zustand übergehen kann.

E Phasenbeziehungen glykolytischer Intermediate

Aus dem obigen Modell wird deutlich, daß die Adeninnukleotide (ADP, ATP) das oszillatorische Signal entlang der Glykolyse-Sequenz weiterleiten. Als „Sensoren“ kommen zwei weitere Enzyme in Betracht, die ADP als Substrat benutzen: die Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und die Pyruvatkinase (Abbildung 1). In Versuchen mit Hefeextrakt wurden die Konzentrationen sämtlicher glykolytischer Intermediate während der Oszillationen gemessen und die Phasenbeziehungen der Intermediate zueinander bestimmt (Abbildung 7).

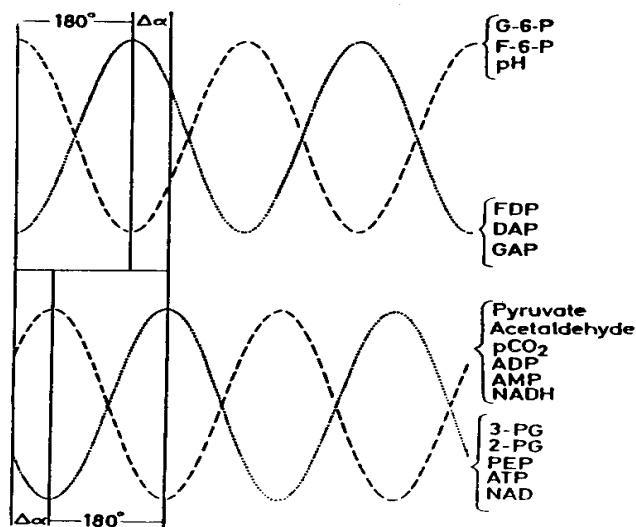


Abbildung 7: Phasenbeziehung der verschiedenen glykolytischen Intermediate zueinander während glykolytischer Oszillationen. Das Diagramm ist in 2 Gruppen unterteilt: für die Intermediate der „oberen“ Glykolyse (C_6 -Körper) und der „unteren“ Glykolyse (C_3 -Körper). Die beiden Gruppen können um einen variablen Winkel α aus der Phase sein. Innerhalb jeder Gruppe gibt es Intermediate, die genau 180° aus der Phase sind.

Aus diesem Diagramm wird deutlich, daß es zwei Gruppen von Intermediaten gibt, in denen eine Phasenverschiebung von 180° auftritt. Es handelt sich dabei um die Substrate und

Produkte der PFK und die Substrate und Produkte der Pyruvatkinase. Zwischen beiden Gruppen existiert noch mal eine Phasenverschiebung um einen variablen Winkel $\Delta\alpha$, der sich zwischen den Substraten und Produkten der Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase einstellt. Die drei Enzyme, die Adeninnukleotide als Substrate/Produkte haben, stellen also wichtige endogene Kontrollpunkte für glykolytische Oszillationen dar.

F Einfluß der Substratzufuhr

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Entstehung glykolytischer Oszillationen ist die Geschwindigkeit mit der das Substrat (Zucker) zugeführt wird. Durch kontinuierliche Infusion von Glukose in einen Hefeextrakt konnten untere und obere Zufuhrraten bestimmt werden, innerhalb derer Oszillationen auftreten (Tabelle 1). Wird dieser Bereich unterschritten, findet keine Aktivierung der PFK statt (zu geringe ADP-Produktion). Bei zu hoher Substratzufuhr findet keine effektive allosterische Regulation statt - die PFK wird durch das Substrat regelrecht überschwemmt.

Tabelle 1: Dynamik glykolytischer Oszillationen als Funktion der Substratzufuhr

Hefeextrakt wurde durch eine Pumpe mit Glukose versorgt. Dies führt zu Oszillationen der Glykolyse. Die Geschwindigkeit der Glukosezufuhr wurde während eines Versuches von <20 mM/h bis auf > 120 mM/h erhöht. Die Tabelle gibt die Werte für Periode und Amplitude der auftretenden Oszillationen an.

Substratzufuhr rate (Glukose)	Periodendauer	Amplitude
[mM/h]	[min]	[mM NADH]
<20	---	konstant hohe Konzentration
20	8,6	0,2-0,4
40	6,5	0,6
60-80	5,0	0,3
120	3,5	0,2
>120	---	konstant niedrige Konzentration

VI Versuchsdurchführung

I Benötigte Lösungen und Geräte:

- Hefeextrakt,
- 0,024M NAD,
- KH_2PO_4 , 2M, pH 6,5,
- Trehalose, 1M,
- ADP, 0,1 M, pH 6,5,
- Destilliertes Wasser (Aq. dest.),
- Küvetten aus optischem Spezialglas, Schichtdicke 0,1 mm,
- Automatische Pipetten,
- Spektralphotometer,
- Eppendorf-Reaktionsgefäße, 0,5 ml.

Es sollen glykolytische Oszillationen in einem Hefeextrakt induziert und spektralphotometrisch aufgezeichnet werden. Als Substrat dient das Disaccharid Trehalose, das aus 2 Glukoseeinheiten besteht. Durch das Enzym Trehalase wird das Disaccharid in seine Monomere gespalten, die dann als Substrat der Glykolyse fungieren. Für die Messung der glykolytischen Reaktion wird die Absorption von NADH verfolgt. Die Oxidation/Reduktion von NADH/NAD ist direkt an den glykolytischen Fluß gekoppelt, so daß Konzentrationsänderungen dieses Moleküls direkt den glykolytischen Fluß widerspiegeln (Abbildung 1). NADH kann einfach über sein Absorptionsmaximum bei 340 nm bestimmt werden (Molarer Absorptionskoeffizient bei 340nm (ϵ_{340}) = $6,3 \text{ l mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Versuch:

Pipettieren Sie ein Eppendorf-Reaktionsgefäß 10 μl KH_2PO_4 , 10 μl Trehalose μl und 2 μl NAD. Die Reaktion durch Zugabe von 173 μl Hefeextrakt, starten und die Lösung gut mischen. Danach die Lösung sofort in eine Küvette überführen und in den Lichtstrahl eines Spektralphotometers plazieren. Die Absorption des NADH bei 340 nm als Funktion der Zeit messen.

Bestimmen Sie Frequenz und Amplitude der Oszillationen. Berechnen Sie die Amplitudenkonzentration des NADH nach Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \times c \times d$$

mit A = Absorption, ϵ = molarer Absorptionskoeffizient von NADH ($6,3 \text{ l mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), c = Konzentration von NADH und d = Schichtdicke der Küvette.

Geben Sie beim Maximum des zweiten Zyklus 5 μ l ADP zu der Lösung. Wiederholen Sie dies zum Minimum des vierten Zyklus.

Warum hat ADP bei der ersten Zugabe keinen Einfluß? Worauf ist die Phasenverschiebung bei der zweiten Zugabe von ADP zurückzuführen? Nehmen Sie zur Beantwortung dieser Frage das Phasendiagramm (Abbildung 7) zu Hilfe.